



TITLE:

DNAオリガミを使ってできること

AUTHOR(S):

板東, 俊和; 杉山, 弘; 朴, 昭映; 山本, 清義; 谷口, 純一

CITATION:

板東, 俊和 ...[et al]. DNAオリガミを使ってできること. 京都大学アカデミックデイ2014: ポスター/展示 2014

ISSUE DATE:

2014-09-28

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/196011>

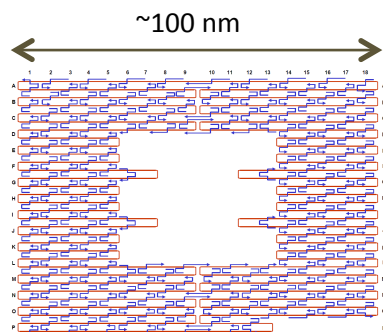
RIGHT:

分子科学的アプローチによる 遺伝子発現の制御と機構の解明

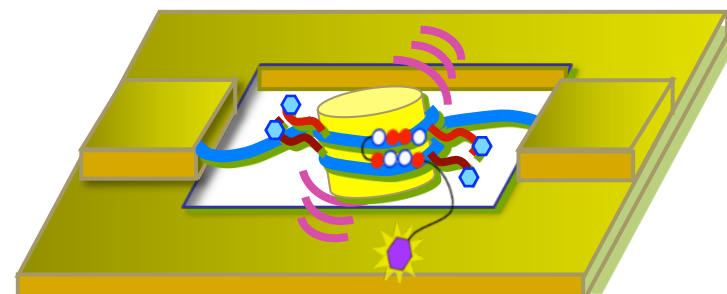
京都大学 大学院理学研究科
化学専攻 生物化学研究室

研究目的： 2つの分子化学的アプローチを駆使して研究を進めている

- 1) エピジェネティックな遺伝子発現の特異的な制御機構について、DNAフレームを利用して、**直接可視化し解析する手法の開発**

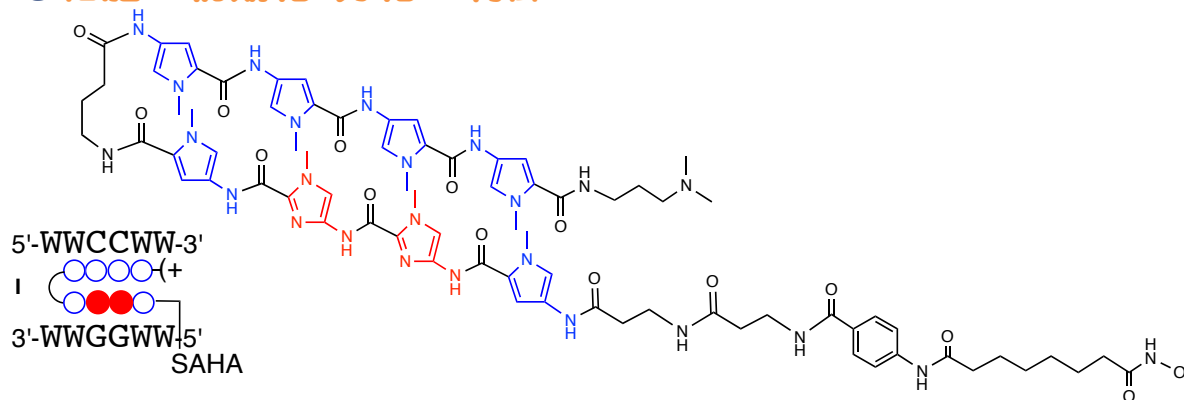
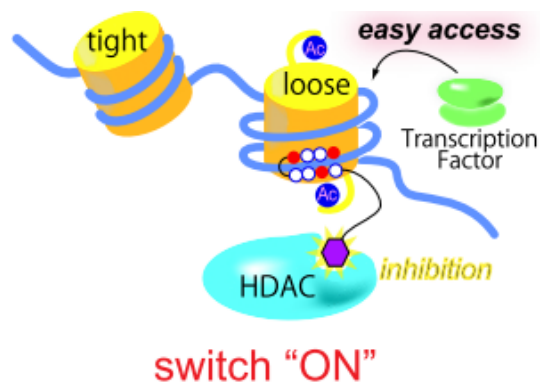


DNA フレーム



エピジェネティックな変化を1分子観測

- 2) エピジェネティックな遺伝子発現の活性化能を付与したDNA配列特異的結合分子による**細胞の初期化・分化の制御**



ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)においてOct 3/4, Nanog の発現上昇

細胞

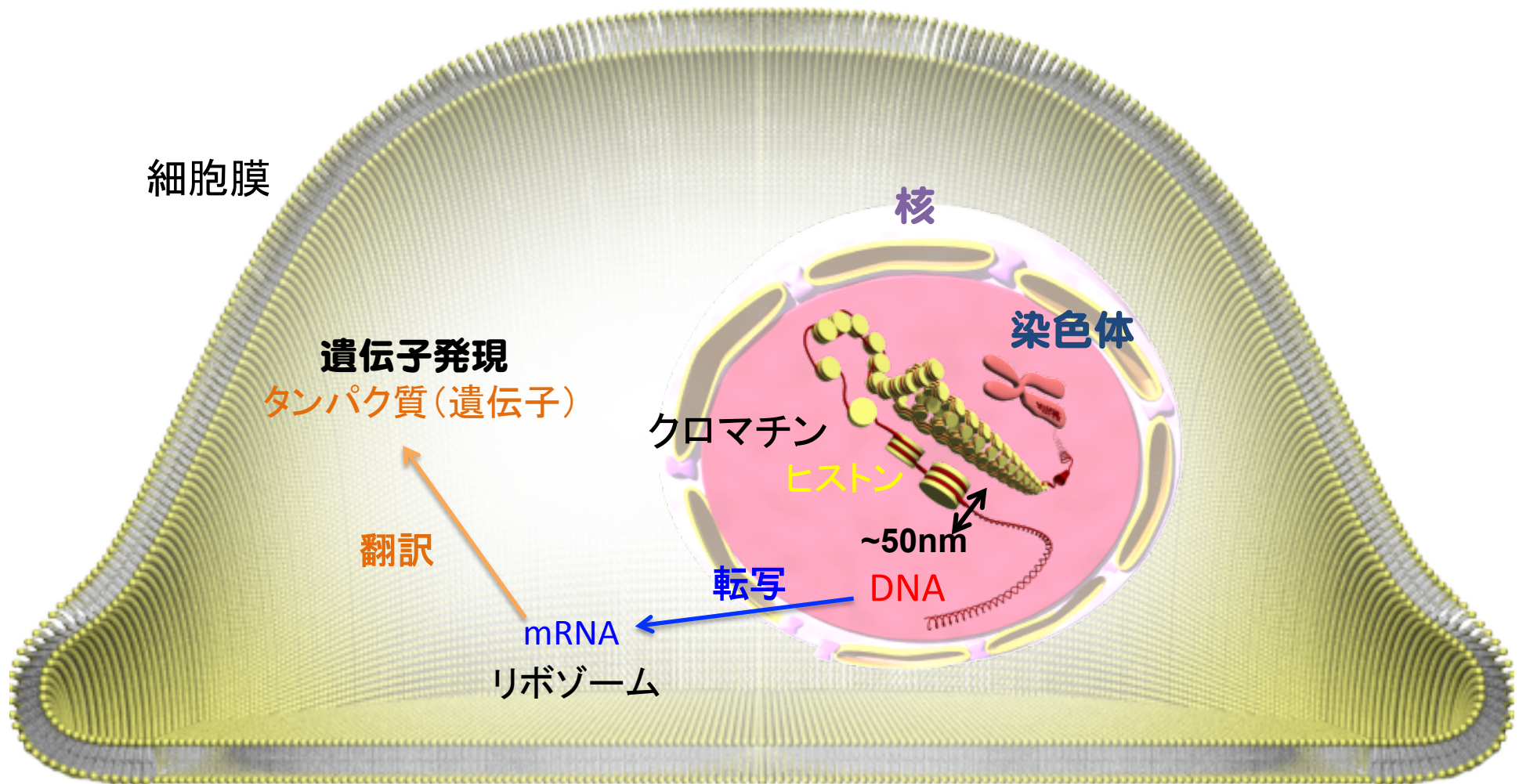
生物の構造・機能における基本単位

人体＝約60兆個の細胞で構成される

核＝細胞内小器官、内部に46本の染色体を持っている

染色体＝細胞の遺伝情報の保存と伝達を担う
(Chromosome)

クロマチン＝DNAとヒストン(タンパク質)で構成される構造体
(Chromatin)



DNA

塩基配列情報が
保存されている生体分子



B-DNA

右巻き二重らせん構造

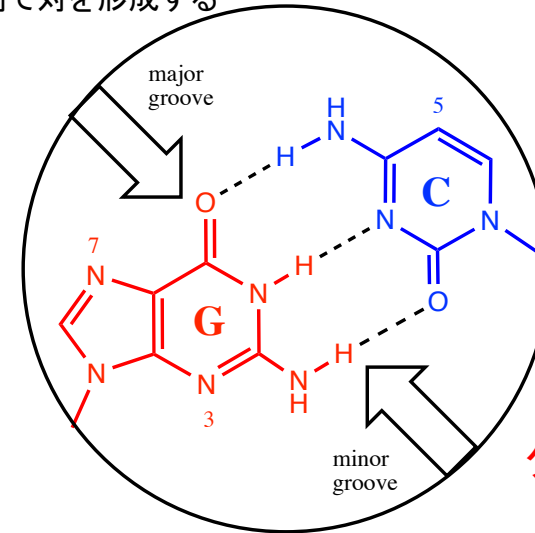
minor groove
1.1 nm

major groove
2.2 nm

2 nm

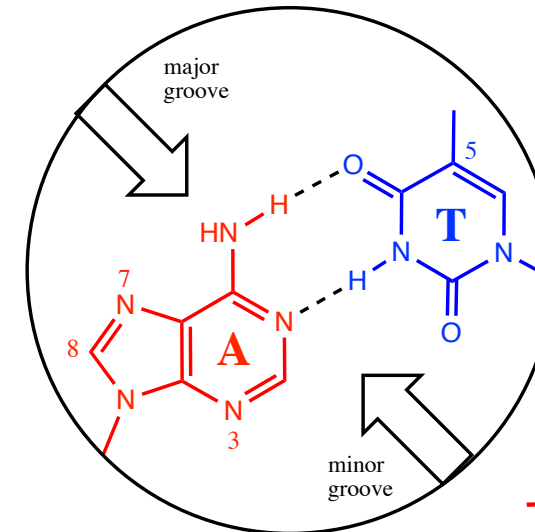
塩基対 (base pair):
A-T, G-C塩基間で対を形成する

シトシン (C)



グアニン (G)

チミン (T)



アデニン (A)

12塩基対からなる二本鎖DNA の二重らせん構造モデル

主溝 (major groove) と副溝 (minor groove) が交互に現れている

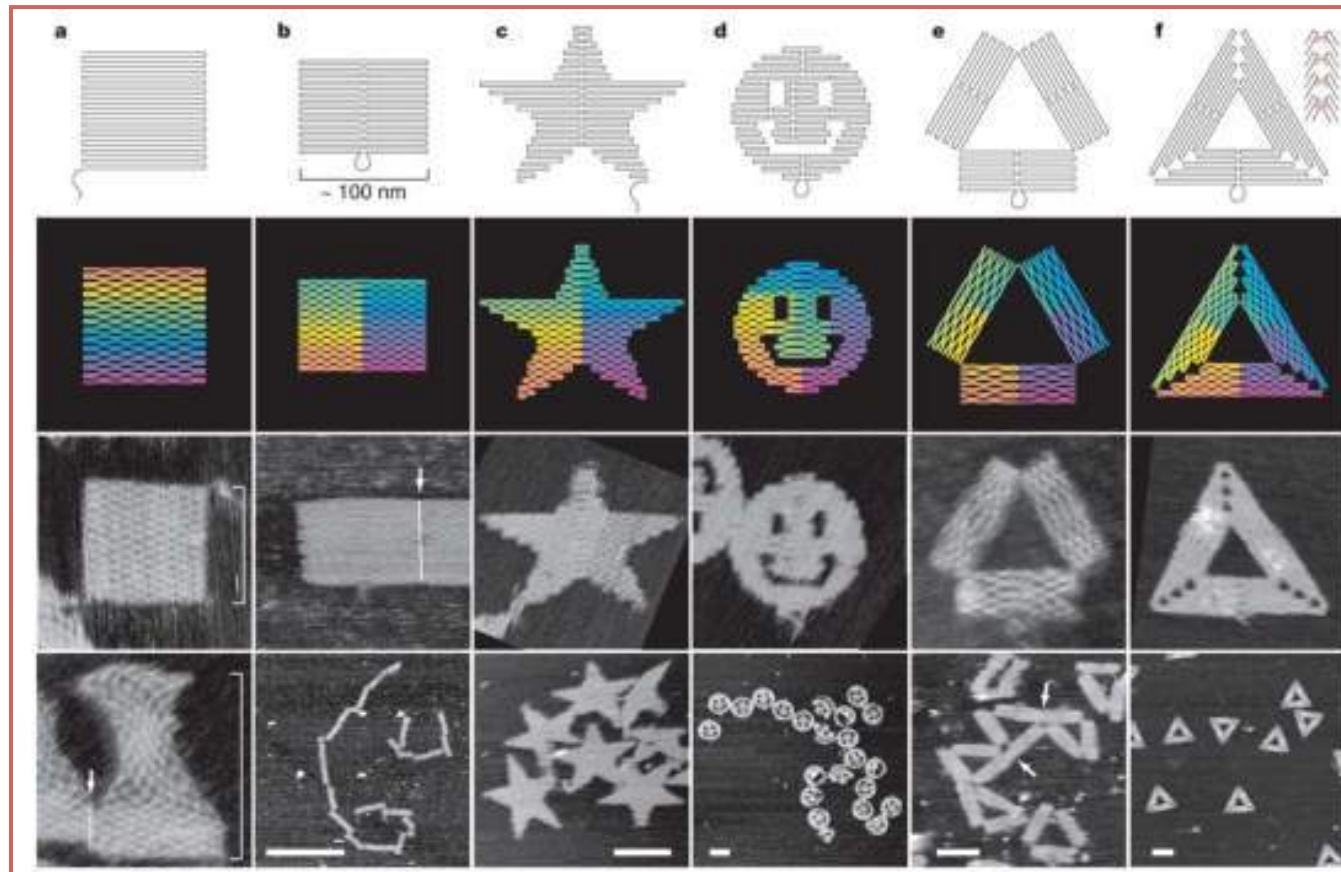
塩基対 (base pair) はらせん内部に存在している (実際に分子モデルで確認！)

ナノテクノロジー研究において魅力的な素材！「DNA」は任意に形状を設計することができる！

DNAの良い所

1. 「塩基対」を利用して配列特異的に分子を構築することができる点 (program)
2. 空間的に「二重らせん構造体」として考えて設計することができる点 (geometry)

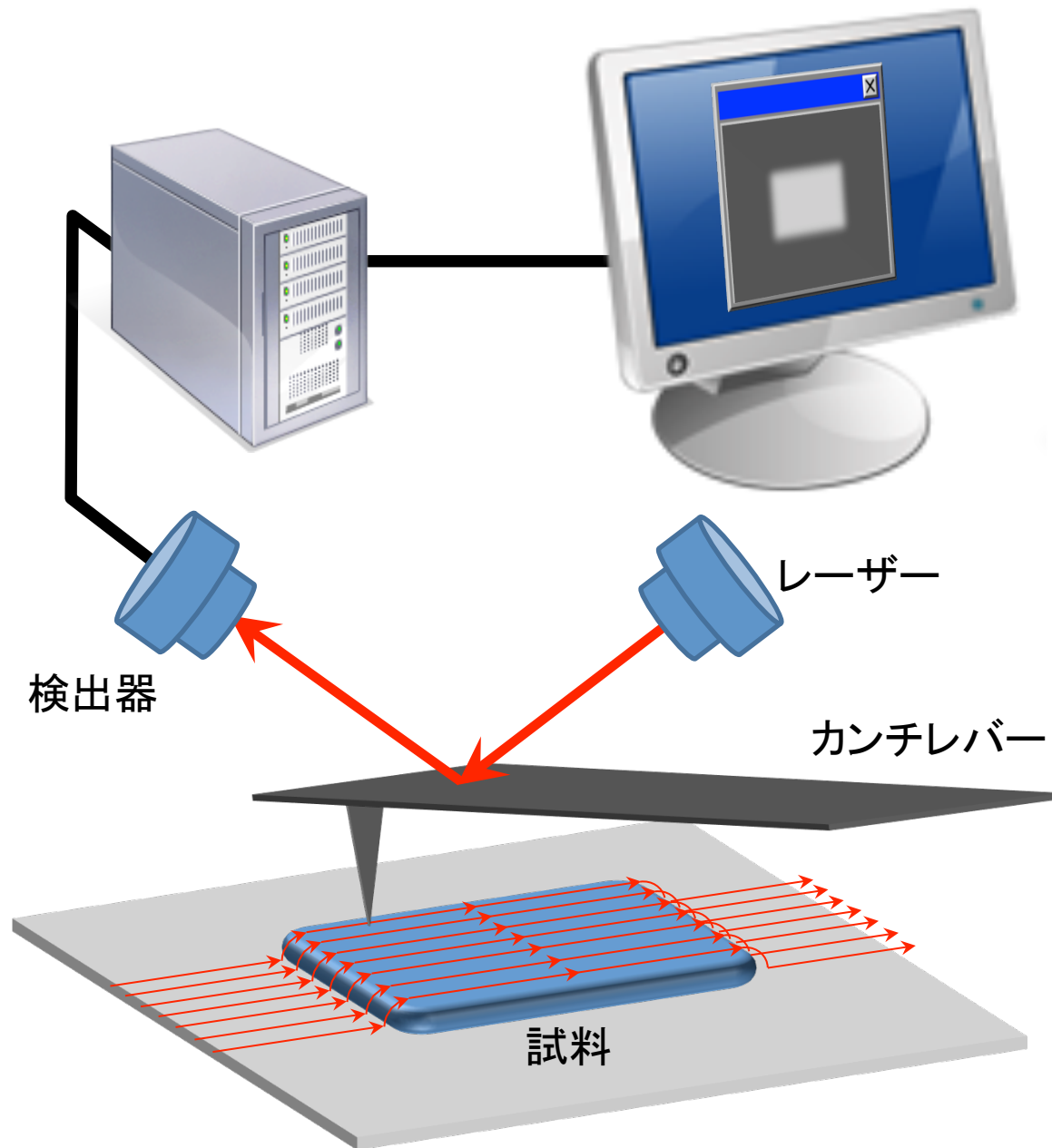
“DNA 折り紙” 法



Rothemund, *Nature*, 2006, 440, 297.

数百nmスケールで様々な 2D, 3D のナノ構造体を望むように設計・合成することができる

AFM (Atomic Force Microscope) : 原子間力顕微鏡



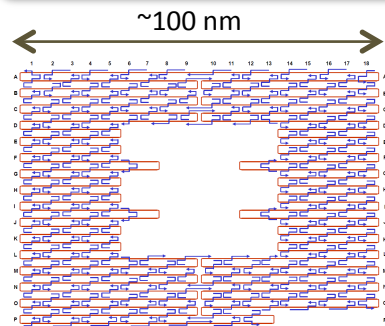
カンチレバーの先についた針と試料の間に働く力
(原子間力)
レーザーで検出しながら、
試料の表面を針でなぞる
(走査する)



**試料の表面の凹凸情報を
画像(動画)として得る**



DNAナノ構造の設計と構築



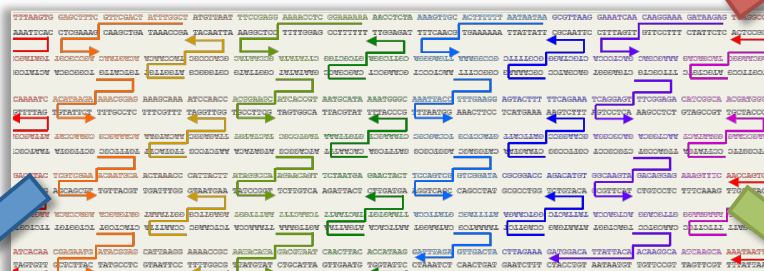
J. Am. Chem. Soc. 132, 1592 (2010)

新規二次元構造体 DNA フレーム

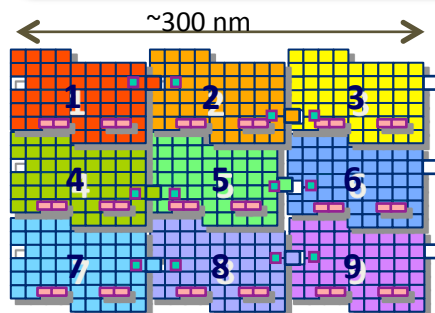
京都大学 大学院理学研究科
化学専攻 生物化学研究室

DNA 折り紙技術

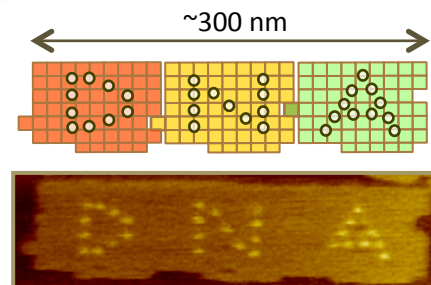
Review: *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 874 (2012)



多様なDNAピースを任意に 構成する技術



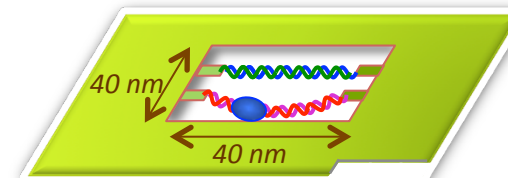
ACS Nano, 5, 665 (2011)



Chem. Eur. J. 16, 5362 (2010)

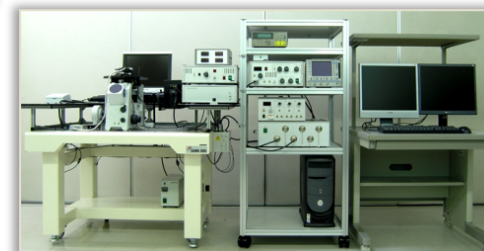
J. Am. Chem. Soc. 133, 14488 (2011)

DNAと酵素の反応を 可視化する技術



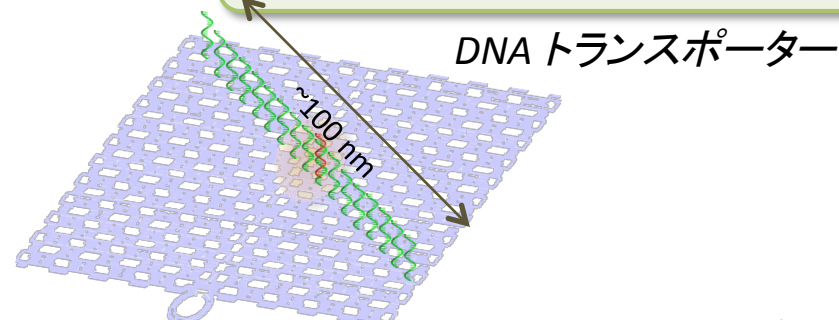
J. Am. Chem. Soc. 132, 16311 (2010)

Angew. Chem. Int. Ed. 49, 9412 (2010)



High-speed AFM imaging system

特異的な機能を付与した単分子 DNAの挙動を観察する技術



Nature Nanotechnology, 6, 166 (2011)

Nature Nanotechnology, 7, 169 (2012)

DNAオリガミの折り方:2次元DNAナノ構造体の構築方法

Template (鋳型) DNA

Staple (かすがい、ホッチキス) DNA

+

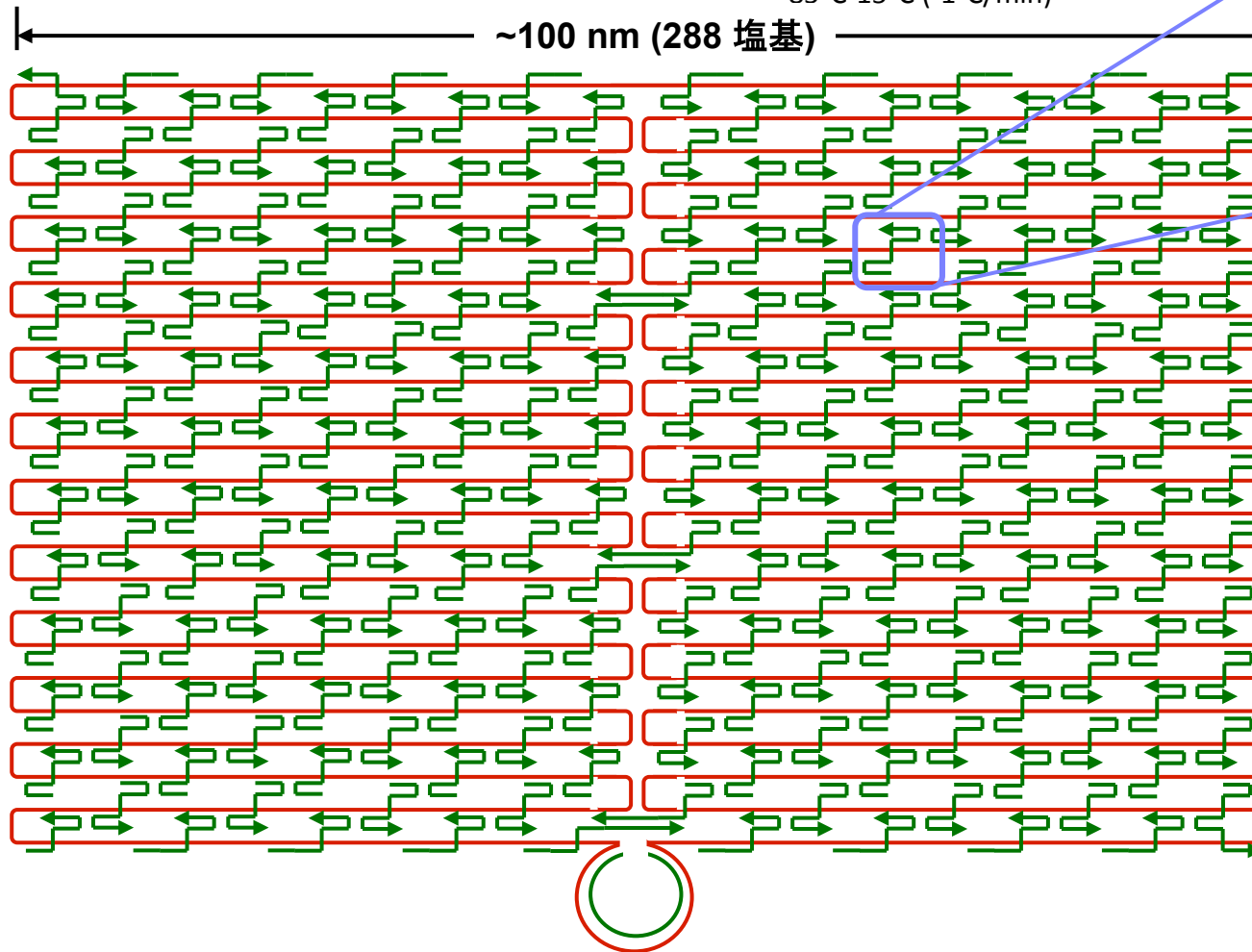
相補的な塩基配列を持つ DNA (226 種類)

一本鎖 DNA テンプレート
(M13mp18 DNA: 7249 bases)

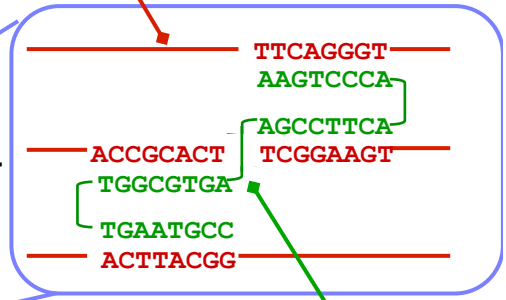
プログラム化された DNA 構築

85°C-15°C (-1°C/min)

~100 nm (288 塩基)

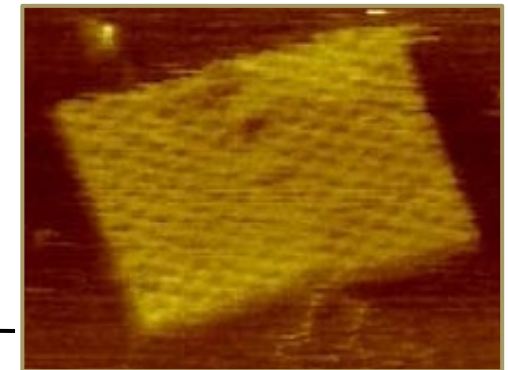


一本鎖DNA M13mp18



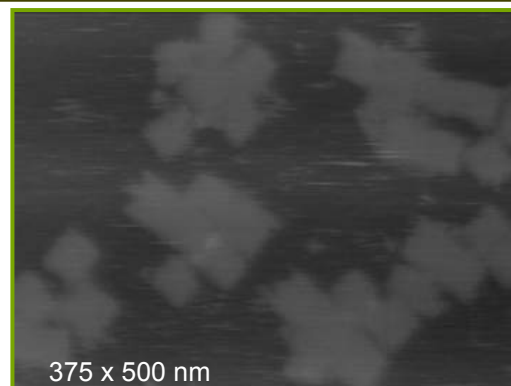
32-mer staple 一本鎖DNA

~70 nm
(12回の折り返し)



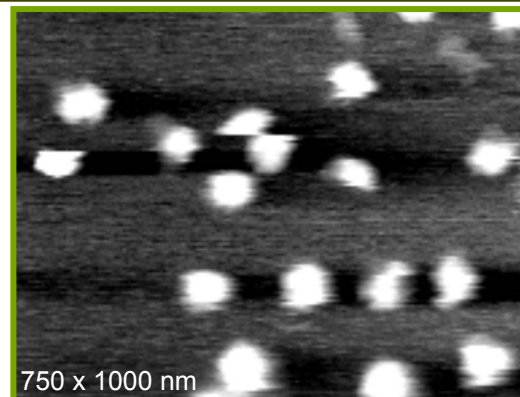
高解像度AFMイメージ

DNA Box 構造形成と、開箱プロセスのリアルタイム観測



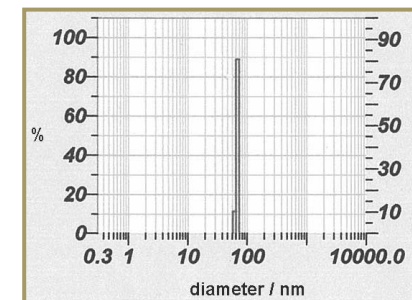
2D **opened Box**

folding
→
+Staple



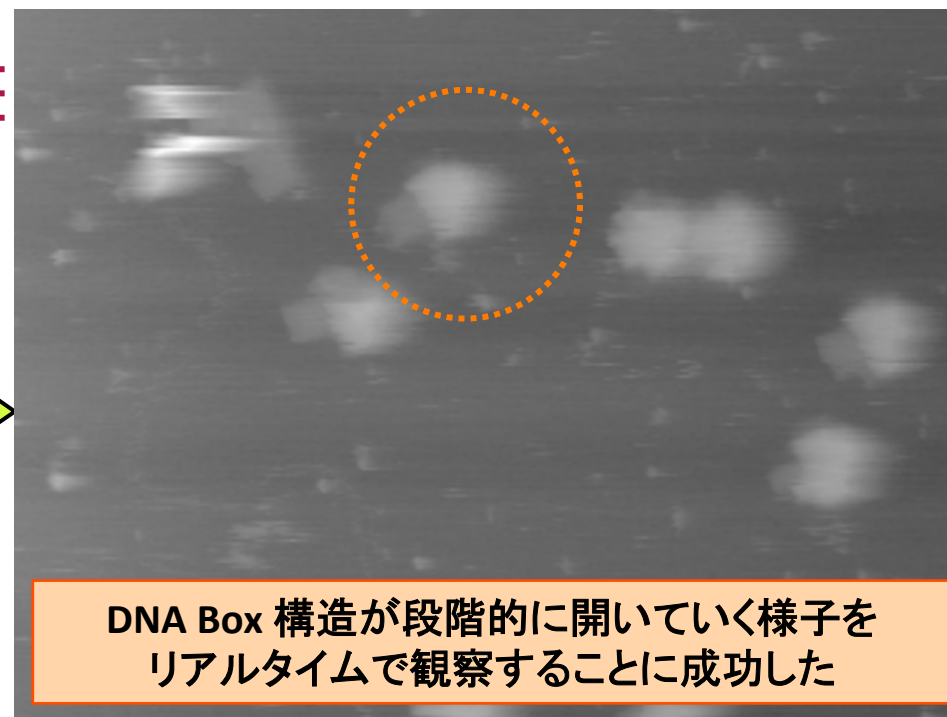
3D **Box**

動的光散乱法(DLS)による分析

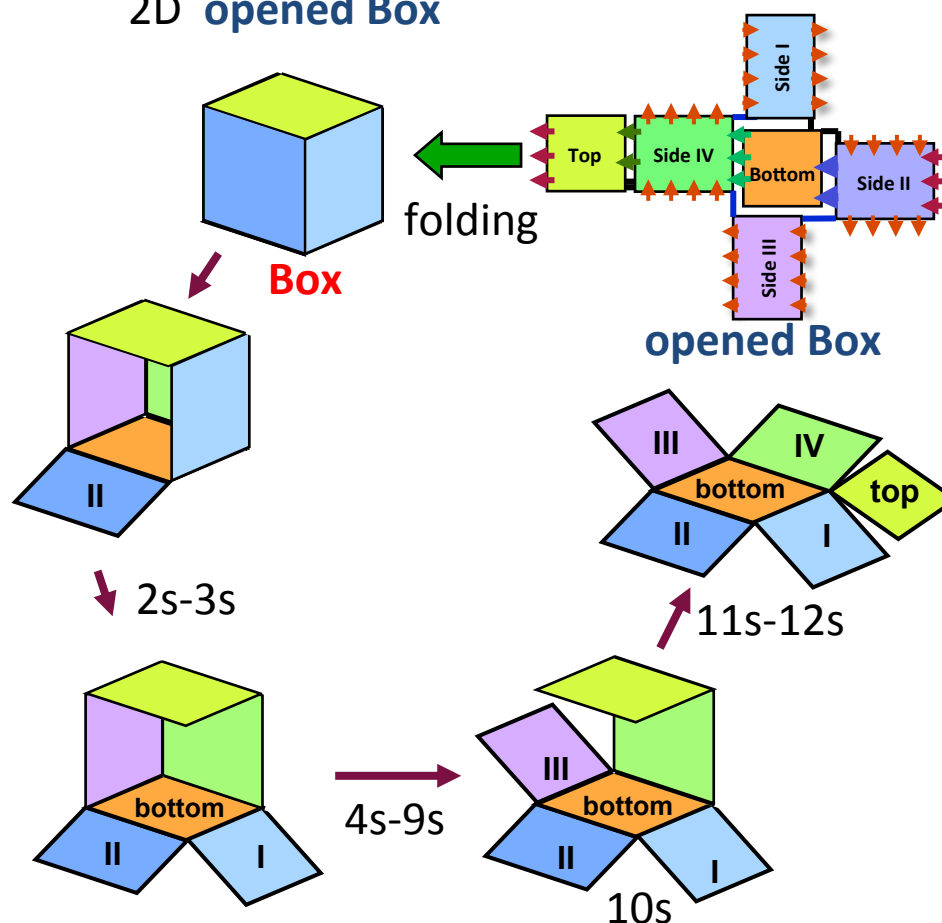


観測値: 直径 68 nm (89%)
(計算値: 直径67 nm)

開箱プロセスのAFM イメージ

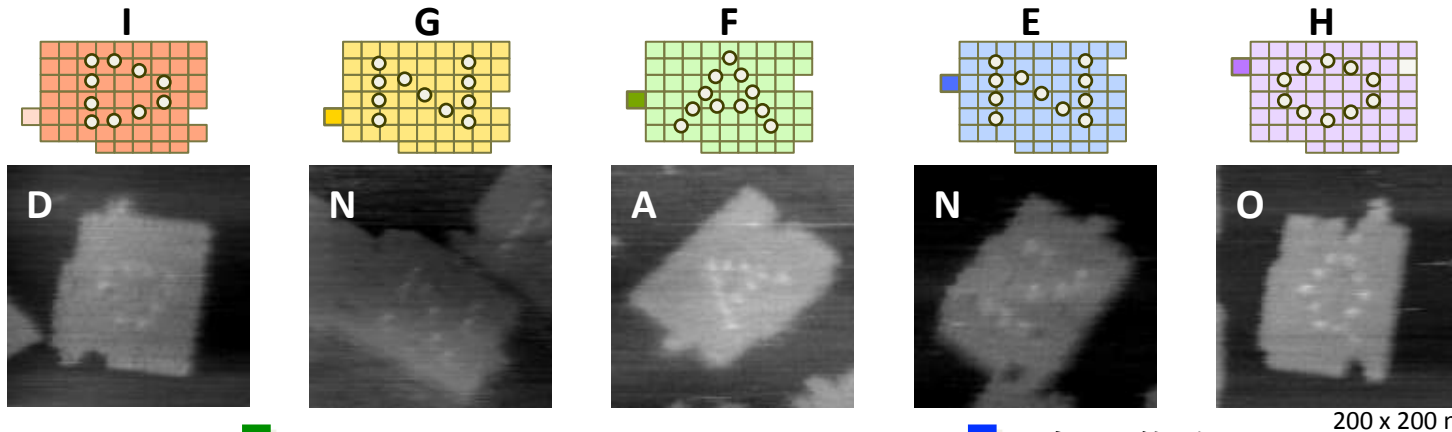


1 image / sec

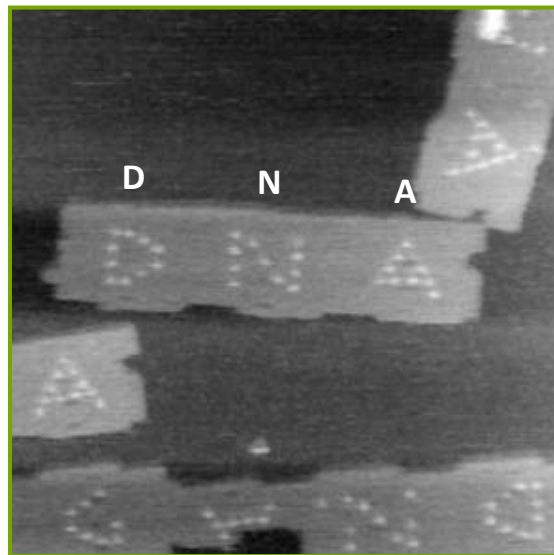
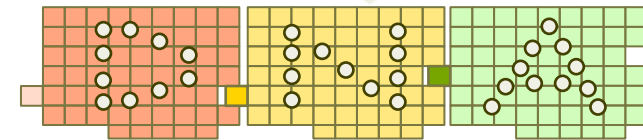


複数のDNAパスルピースからプログラム化された自己集合によって、文字を表示させる

パスルピース
monomer

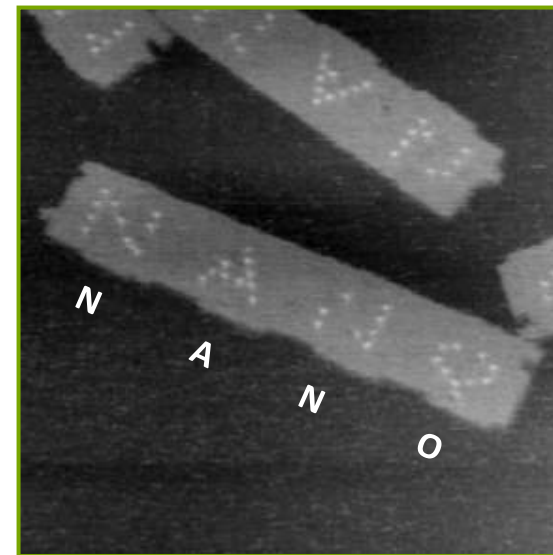
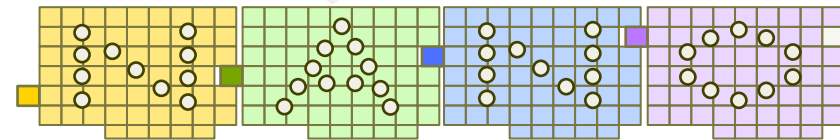


自己集合



500 x 500 nm

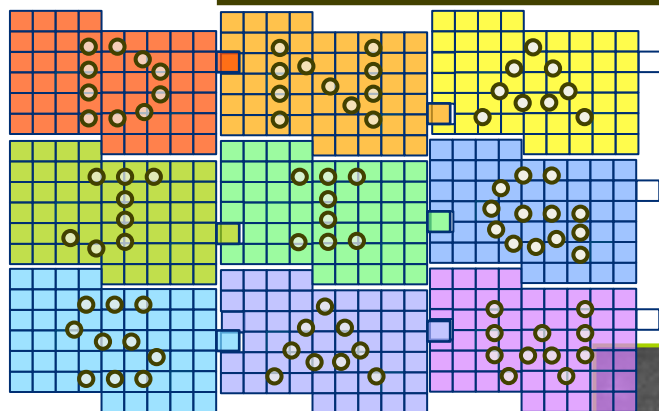
自己集合



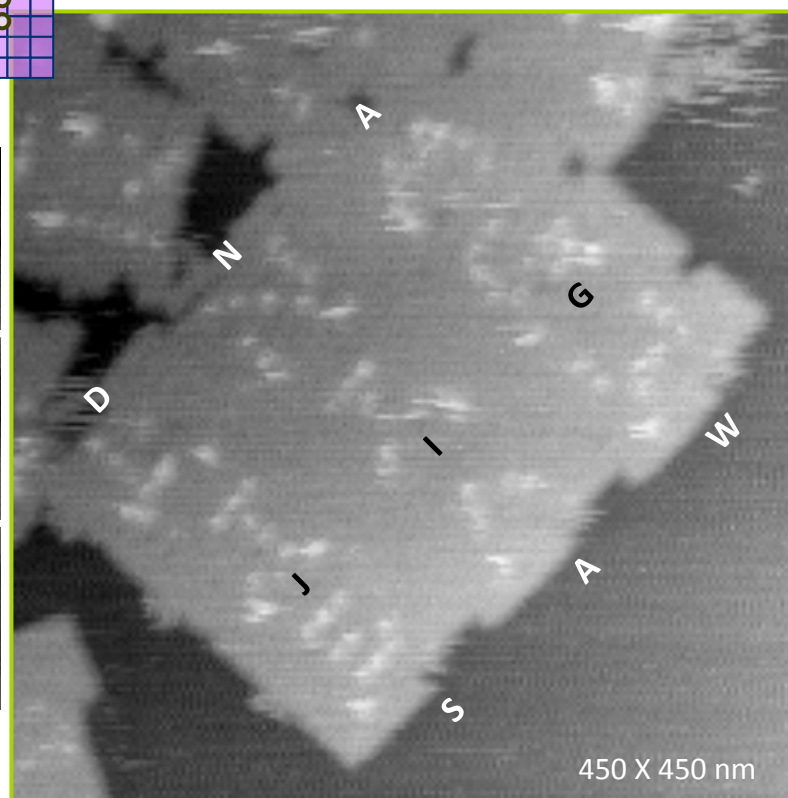
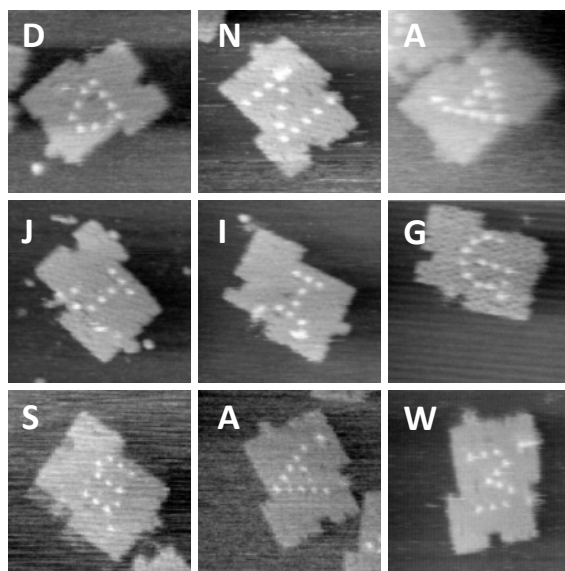
525 x 525 nm

DNAナノ構造体が優れた「ナノマテリアル」になる可能性を示している

複数の2次元DNAジグソーピースを用いるプログラム化した2次元自己集合



DNA JIGSAW



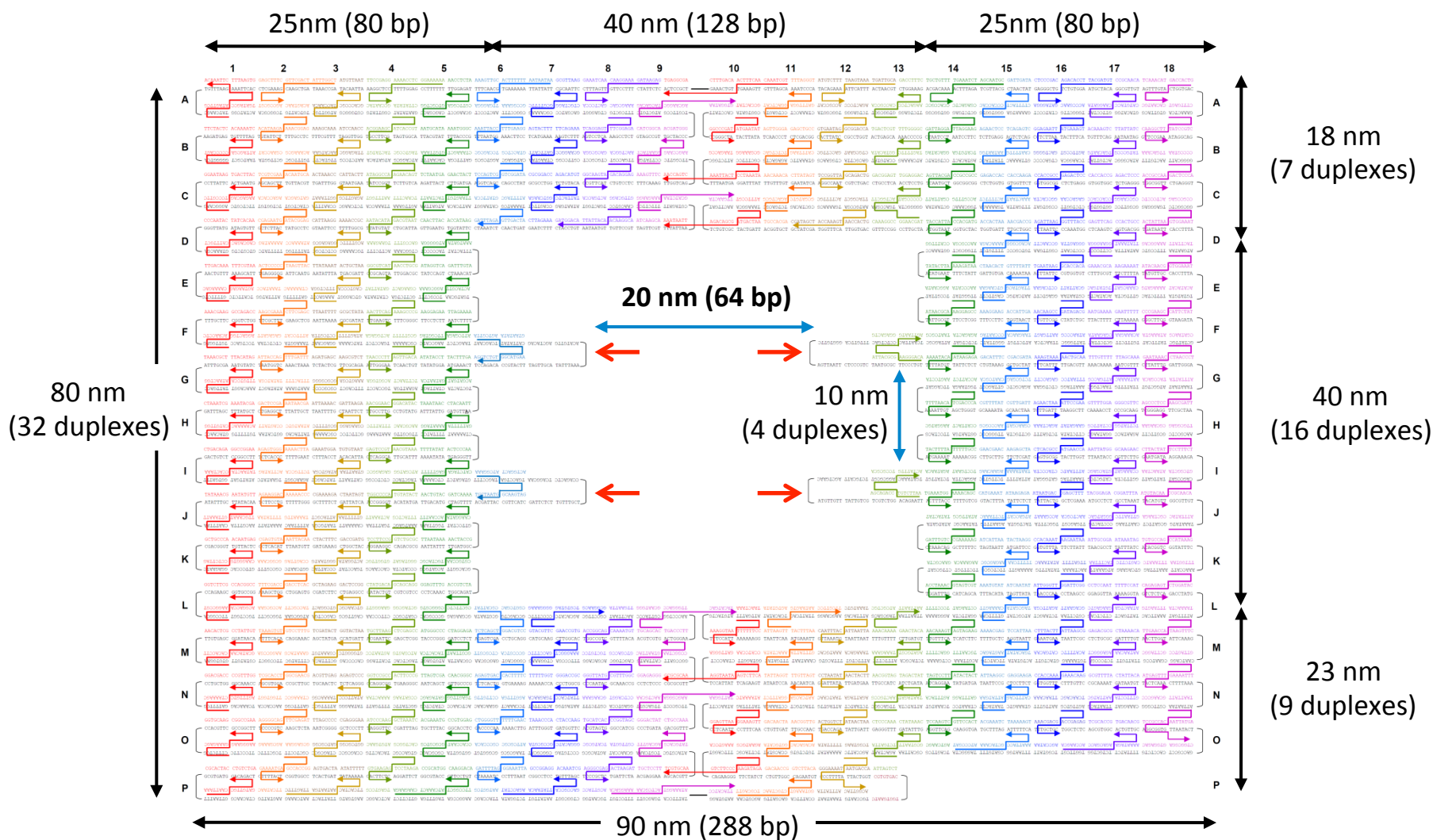
ACS Nano
No. 5 Vol. 1, 2011
(表紙に採用された)



2次元DNA ジグソーピースによる自己集合技術は、
水平と垂直、両方向へ応用が広がっていくだろう

ACS Nano, 5, 665-671 (2011).

4種の連結部を内包したDNAフレーム構造体の設計



連結部には任意の配列、長さをもったDNA鎖を組み込むことが可能

我々の開発技術: DNAフレーム技術によってDNAの構造変化や酵素反応を単分子観測する

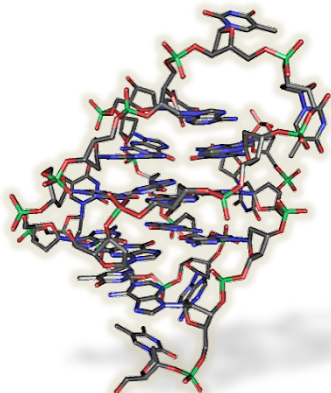
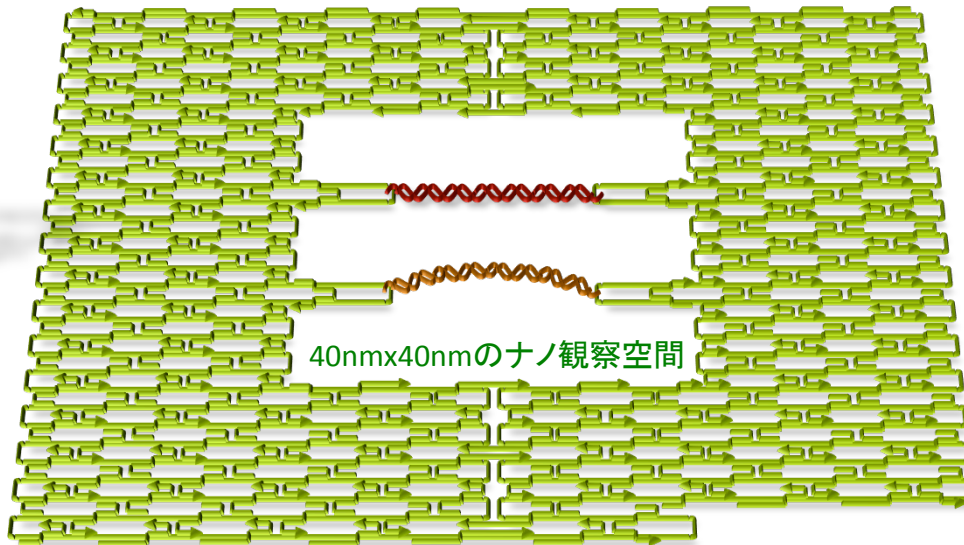
DNA オリガミ技術



高速AFM測定技術



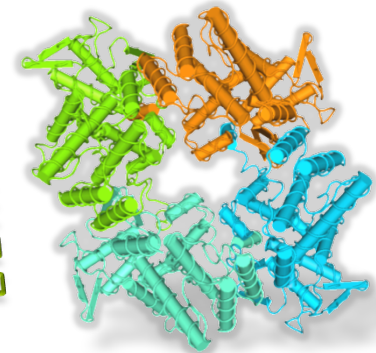
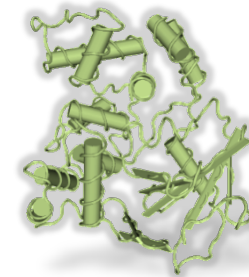
DNAフレーム単分子観察技術



G-4重鎖構造

DNAの構造変化

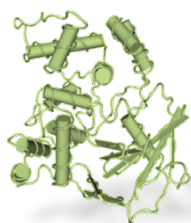
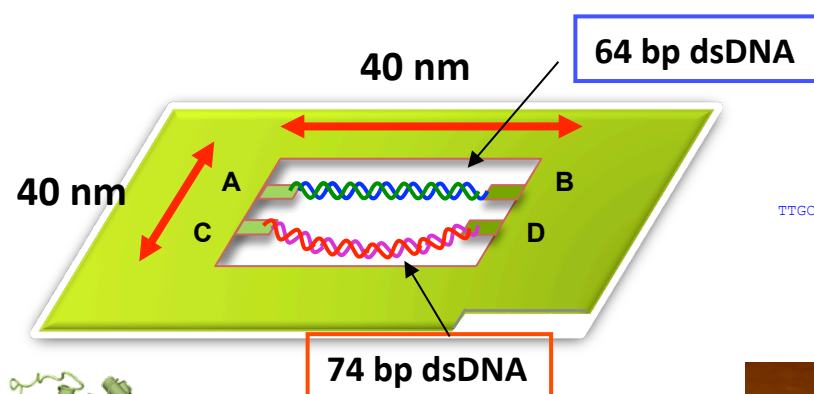
G-4重鎖構造の形成



酵素反応

DNA メチル化転移酵素

DNA 再構成酵素

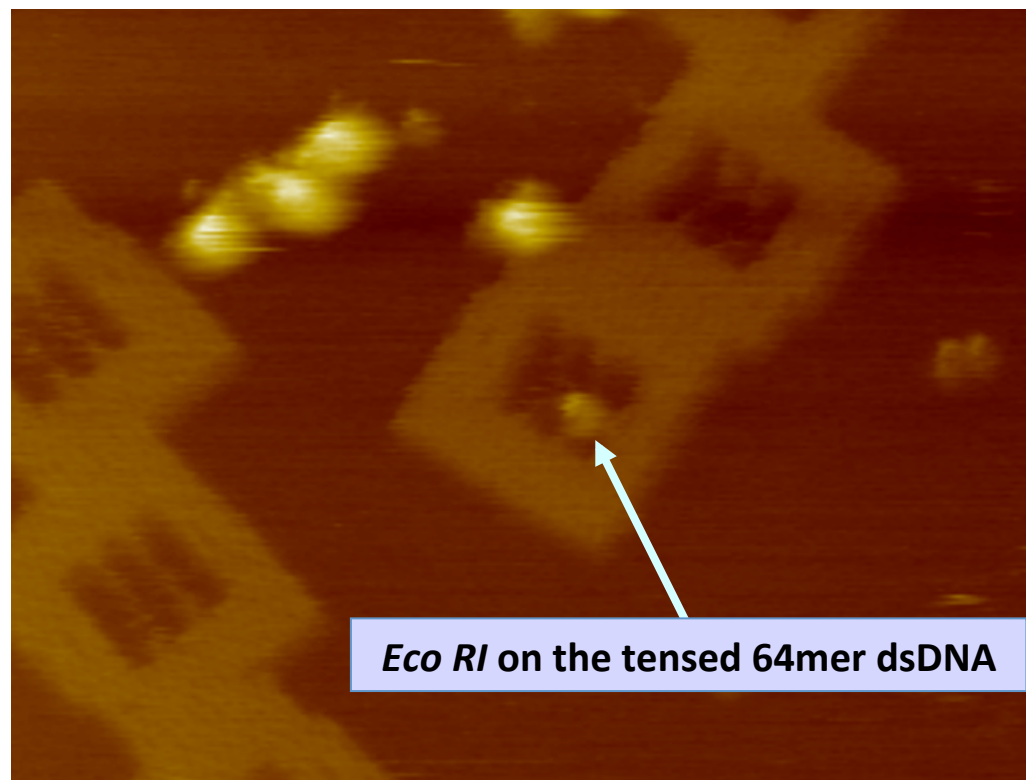
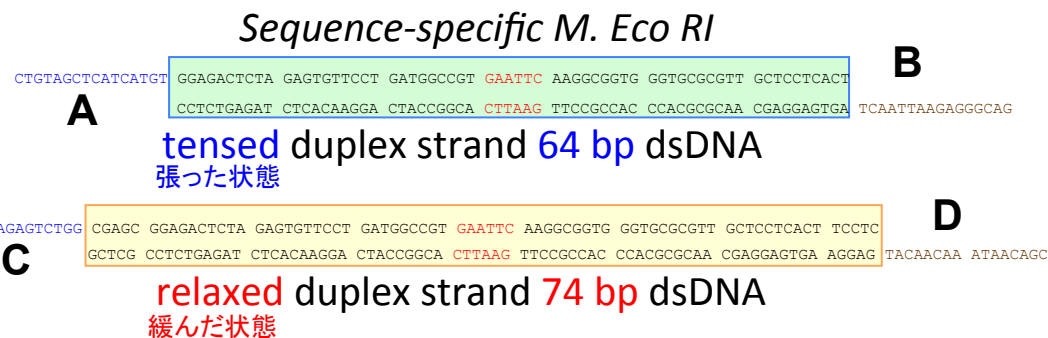


EcoRI メチル化転移酵素

DNA 鎖を折り曲げてアデニンの N6 位をメチル化するメチル転移酵素

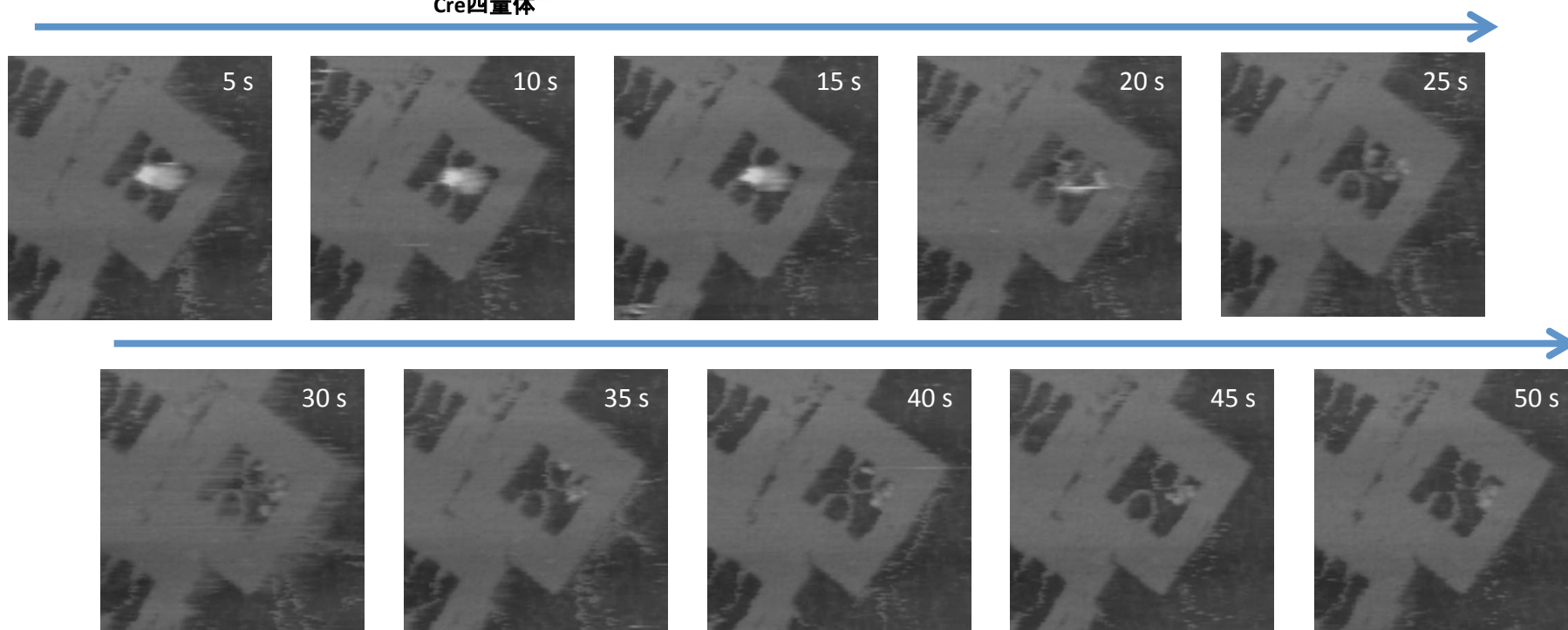
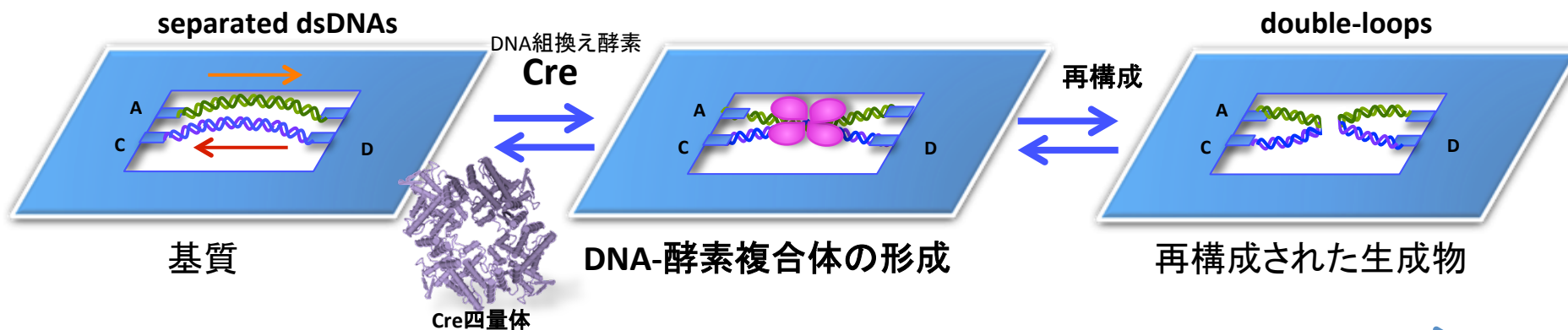
40x40 nmのナノ空間内の
単一の酵素分子の挙動を
リアルタイム観察

DNAフレーム内で
起きているメチル化反応の
数をカウントする



1 frame / sec

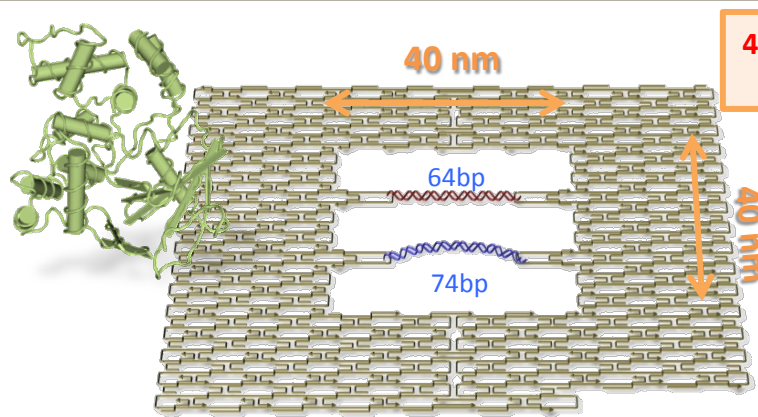
メチル化観測数: 74 塩基対 (緩んだ状態) = 43%, 64 塩基対 (張った状態) = 13% (118 フレーム中)



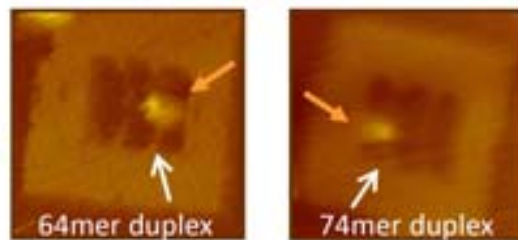
0.2 frame / sec (5 x speed)

Cre 四量体による再構成反応プロセスを初めてリアルタイムで直接観察することに成功した
Cre 四量体は再構成の後、4つのモノマーに解離している

DNAフレーム技術によって様々な酵素のダイナミックな結合や反応過程をリアルタイムで観察する



EcoRI methyl transferase on the 74bp DNA strand



EcoRI methyltransferase

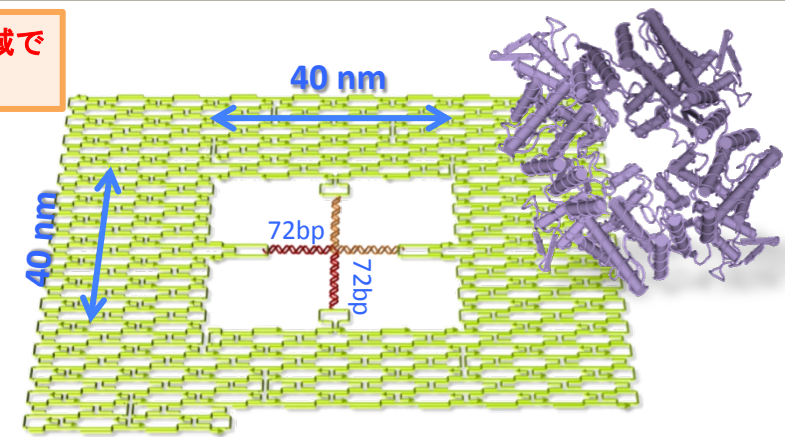
張力による酵素の反応性の違い

64 塩基対 (張った状態) と 74 塩基対 (緩んだ状態)



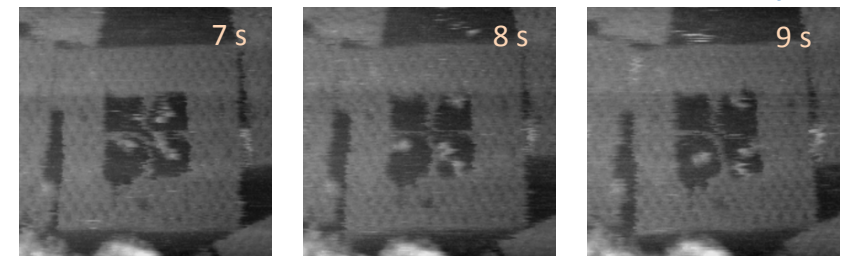
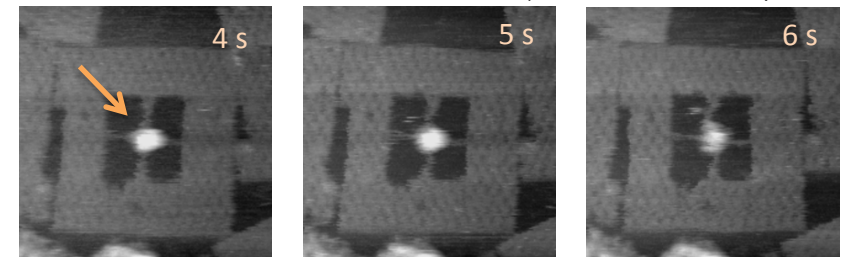
観察結果: より折り曲げやすい
74 塩基対の配列が
メチル化されやすい

J. Am. Chem. Soc., 132, 1592-1597 (2010)



Cre recombinase on the Holiday Junction

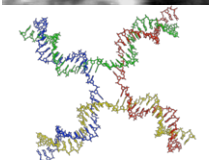
180 x 180 nm, Scan rate: 1.0 frame / sec



Cre: DNA組換え酵素
Holiday Junction を経由して
鎖交換反応を触媒する

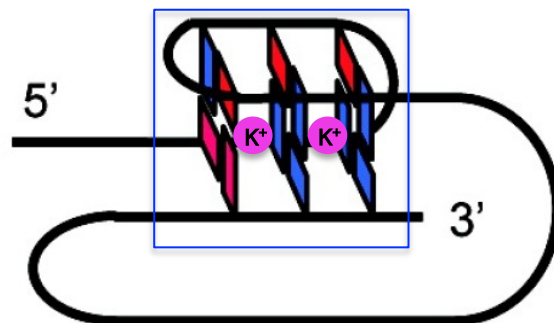
Holiday Junction:

4本の鎖の間に
形成される構造



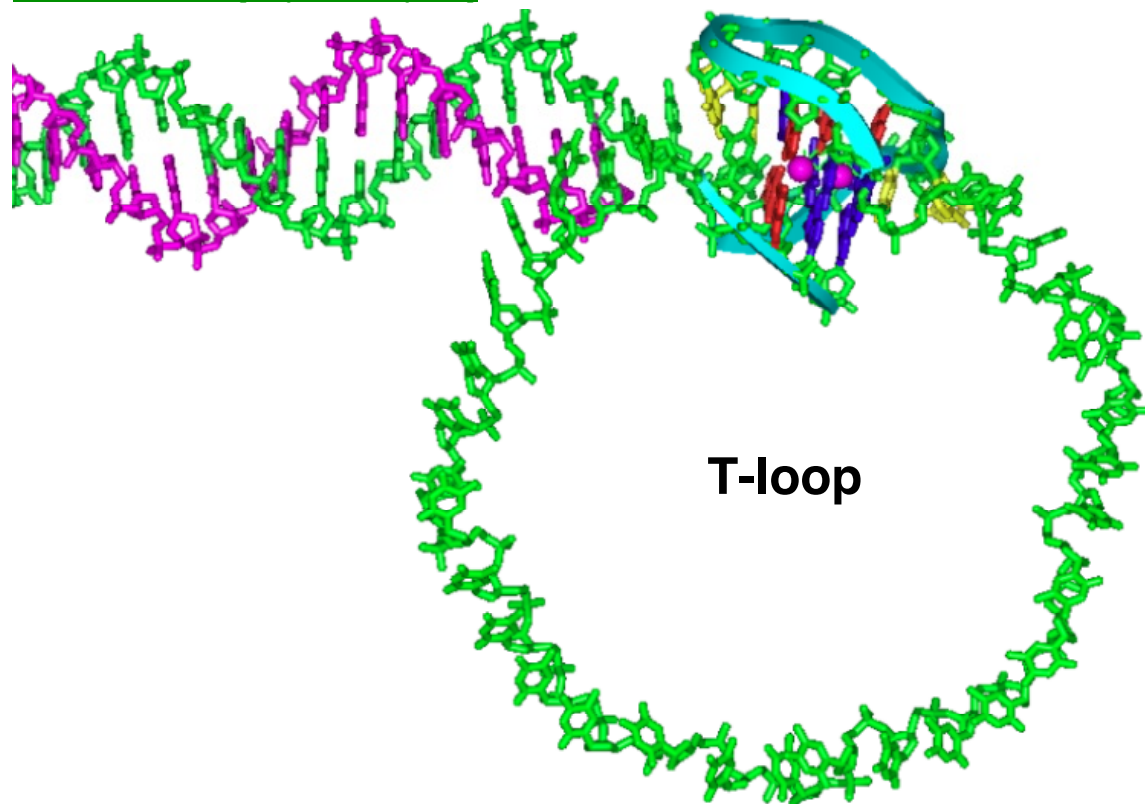
Nucleic Acids Res., 42, 7421-7428 (2014)

[3+1] Hybrid 型の G-四重鎖構造

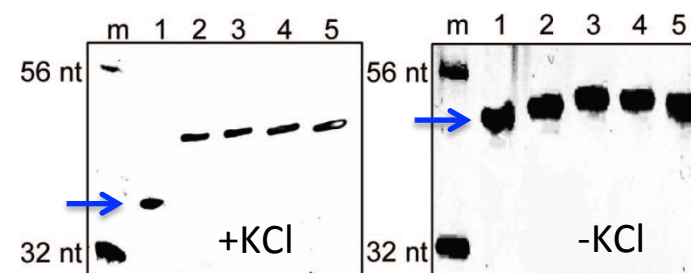


ヒトテロメア配列 [5'-(GGGTTA)n-3']

lariat formation

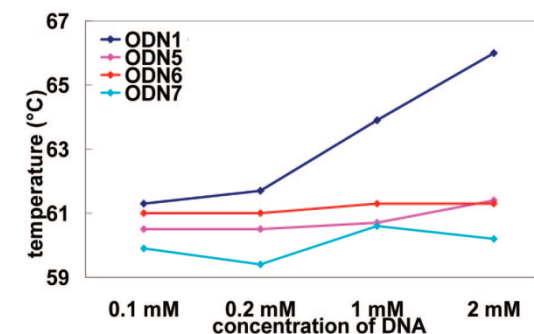
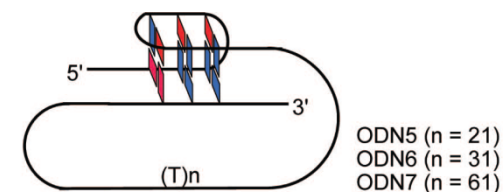


ゲルシフト解析

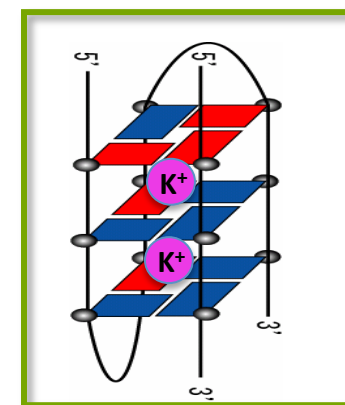
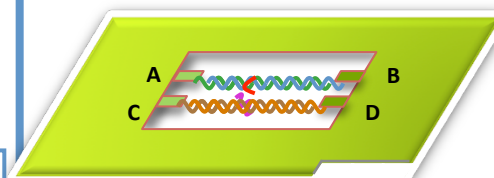
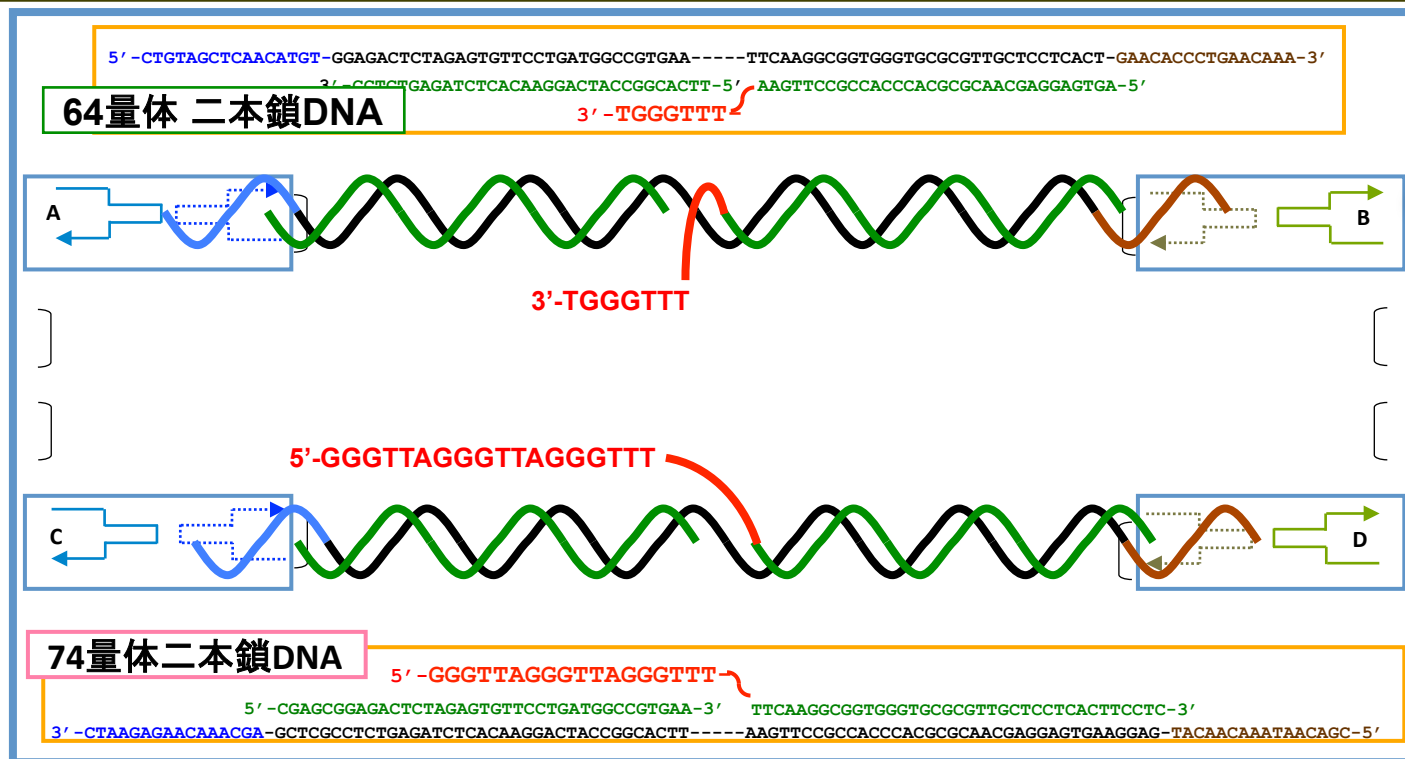


- 1 5'-GGGTTAGGGTTAGGG(T)₂₁GGGT-3'
- 2 5'-GAGTTAGGGTTAGGG(T)₂₁GGGT-3'
- 3 5'-GGGTTAGAGTTAGGG(T)₂₁GGGT-3'
- 4 5'-GGGTTAGAGTTAGGG(T)₂₁AGGT-3'
- 5 5'-AGGTTAGAGTTAGGA(T)₂₁AGGT-3'

濃度依存的なT_m値



DNAフレーム技術によって「単分子」のG-四重鎖構造への形成を確認する

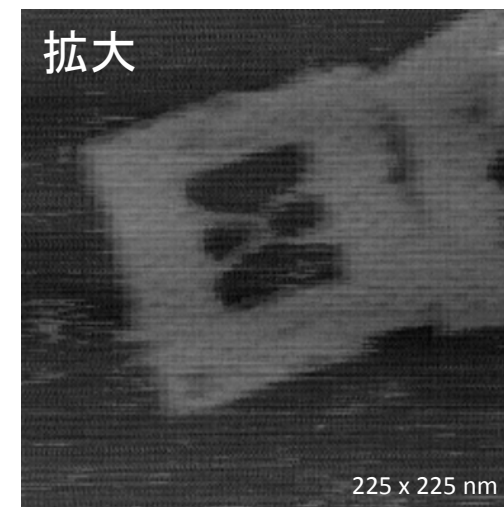
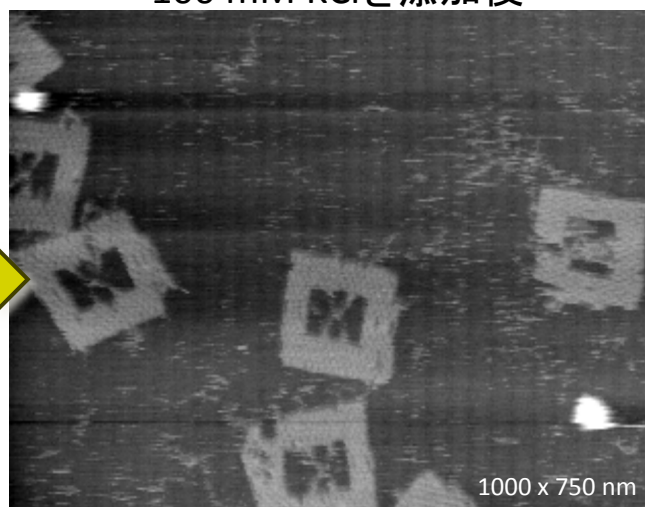


[3 + 1]
G-四重鎖構造

KClが入っていない時

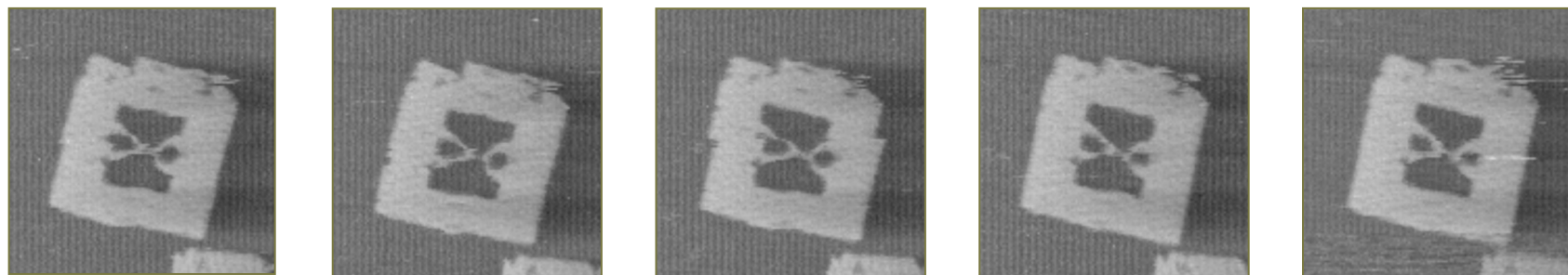
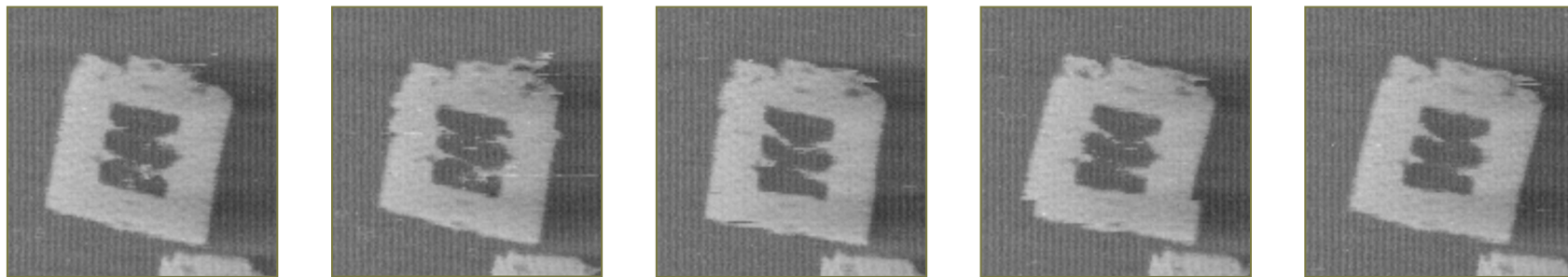
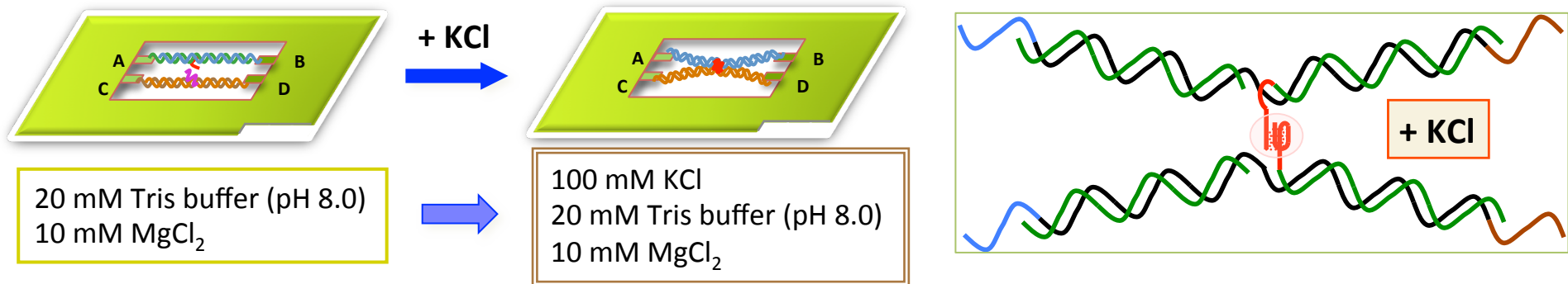
100 mM KClを添加後

拡大



G-四重鎖構造形成 : 44% (220 frames counted)

DNAフレーム技術によってG-四重鎖構造へのダイナミックな形成過程をリアルタイムで観察する



単分子レベルのG-四重鎖構造の形成過程をDNAフレーム内で確認

200 x 200 nm
10 sec / frame